

第37回鳥類内分泌研究会

プログラムおよび要旨集

会期：2013年11月21日（木）－22日（金）

会場：アソシエート

〒869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽 4369-19

第 37 回鳥類内分泌研究会プログラム

2013年11月21-22日

熊本県阿蘇郡南阿蘇村 アソシエート

11月21日 木曜日

11:30 - 13:00 参加受付

13:20 - 13:30 開会の挨拶

研究発表 I : 若手研究奨励賞応募講演 (13:30 - 14:45)

座長：桑山岳人

I-1 ジュウシマツの複雑なさえずりの進化におけるコルチコステロンの機能と神経機構

○鈴木研太^{1,2,4}、松永英治¹、山田裕子^{1,5}、池渕万季^{1,4}、水原誠子^{1,7}、小林哲也³、飯郷雅之^{2,6}、岡ノ谷一夫^{1,3,7} (¹理研 BSI、²宇都宮大 CORE、³埼玉大・理、⁴JST-ERATO、⁵東京海洋大・海洋科学、⁶宇都宮大・農、⁷東大・総合文化)

I-2 ニワトリ卵管における細胞傷害性細胞分布と関連遺伝子の発現に及ぼす伝染性気管支炎 (IB) ウイルス抗原刺激の影響

○新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則 (広島大学 大学院生物圏科学研究科)

I-3 生殖生理と生殖行動を変化させる社会的刺激受容の神経内分泌機構

○戸張靖子¹、ソユリ¹、産賀崇由¹、長谷川喜久²、筒井和義¹
(¹早稲田大・教育総合科学・統合脳科学 ²北里大・獣医学・実験動物学)

座長：筒井和義

I-4 血糖値上昇に伴う摂食抑制機構における視床下部腹内側核の役割

○中森智啓¹、長嶋亮²、浜崎浩子³、佐藤勝重⁴ (¹北里大・医、²北里大・理、³北里大・一般教育、⁴駒沢女子大・人間健康学)

I-5 ニワトリの視床下部で見つけた神経ペプチドが摂食行動と成長に与える影響

○谷内秀輔¹、岩越-浮穴栄子¹、別所裕紀¹、古満芽久美¹、橘 哲也²、浮穴和義¹ (¹広島大・院総科・脳科学、²愛媛大・農・畜産)

研究発表Ⅱ：一般講演（14:45 - 15:00）

座長：筒井和義

Ⅱ-1 ニワトリで発見した神経ペプチド産生細胞の形態学的解析

○別所裕紀¹、岩越-浮穴栄子¹、谷内秀輔¹、前嶋 翔¹、古満芽久美¹、橘 哲也²、浮穴和義¹（¹広島大・院総科・脳科学、²愛媛大・農・畜産）

休憩（15:00-15:15）

特別講演（15:15 - 16:55）

座長：笹浪知宏

SL-1 ニワトリの性分化制御における脳の役割

○浜崎浩子¹、前川文彦²

（¹北里大学・一般教育部・医療系研究科、²（独）国立環境研究所・環境健康研究センター）

SL-2 糖質代謝：エネルギー産生と蛋白変性との関わり

○永井竜児

（東海大学農学部バイオサイエンス学科食品生体調節学研究室）

世話人会（17:00 - 17:40）

懇親会（18:30 - 20:30）

懇話会（20:30 - ）

11月22日 金曜日

7:00 - 9:00 朝食

研究発表Ⅲ：一般講演（9:30 - 11:00）

座長：豊後貴嗣

Ⅲ-1 幼雛期の摂食・エネルギー代謝調節におけるグルコース感受性に関する研究

○白石純一^{1,3}、杉野利久²、豊後貴嗣^{2,3}、太田能之¹、浜崎浩子^{3,4}

（¹日獣大応用生命、²広大院生物圏、³広大 JAB、⁴北里大一般教育）

Ⅲ-2 飼育下における雌スバルバルライチョウ *Lagopus mutus hyperboreus* の繁殖周期

仲村 賢^{1*}、野下智洋^{1*}、黒瀬恵久^{1*}、高橋幸裕²、齋當史恵²、石井淳子^{2*,3**}、山本彩織⁴、楠田哲士⁴、○小川 博¹

（¹東京農業大学、²恩賜上野動物園、³東京都多摩動物公園野生生物保全センター、⁴岐阜大学応用生物科学部、*旧所属、**現所属）

Ⅲ-3 Effects of melanin and estradiol on the expression of *NLRC5* in the oviduct of laying and molting hens.

○Abdel-Mageed Ahmad Mohammad^{1,2}, Isobe Naoki¹, and Yoshimura Yukinori¹.

（¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, ²Faculty of Science, Minia University, Egypt.）

座長：小川 博

Ⅲ-4 鳥類の松果体におけるニューロステロイドの生合成と生理作用

○筒井和義、原口省吾

（早稲田大学教育総合科学／統合脳科学）

Ⅲ-5 ウズラの精子貯蔵管で精子の運動を制御する分子の探索

○笹浪知宏、松崎芽衣、檜山 源、水島秀成

（静岡大学大学院農学研究科）

Ⅲ-6 グレリンの胃腸管運動亢進作用における鳥類の特異性—種々の脊椎動物の

摘出平滑筋標本を用いての検討—

○北澤多喜雄¹、寺岡宏樹¹、海谷啓之²（¹酪農学園大学、²国立循環器病研究センター）

11:00 - 若手研究奨励賞 表彰
閉会の辞

12:00 - 昼食

13:00 - 解散

37th Annual Meeting of Japanese Avian Endocrinology

November 21-22, 2013, Associate, Aso, Kumamoto

November 21

13:20 Opening of the Meeting

SESSION I (13:30-14:45)

I-1 Corticosterone and complex song evolution in Bengalese finches: the role and neural mechanisms.

○Kenta Suzuki^{1,2,4}, Eiji Matsunaga¹, Hiroko Yamada^{1,5}, Maki Ikebuchi^{1,4}, Tomoko Mizuhara^{1,7}, Tetsuya Kobayashi³, Masayuki Iigo^{2,6} and Kazuo Okanoya^{1,3,7} (¹RIKEN BSI, ²Utsunomiya Univ. CORE, ³Saitama Univ., ⁴JST-ERATO, ⁵Tokyo Univ. of Marine Sci. Tech., ⁶Utsunomiya Univ. Agricult., ⁷The Univ. of Tokyo)

I-2 Effects of infectious bronchitis (IB) virus antigen stimulation on cytotoxic cell frequencies and cytotoxic response-related gene expressions in hen oviduct.

○Takahiro Nii, Naoki Isobe and Yukinori Yoshimura (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

I-3 Neuroendocrine mechanisms translating social stimuli into reproductive physiology and behavior.

○Yasuko Tobari¹, You Lee Son¹, Takayoshi Ubuka¹, Yoshihisa Hasegawa² and Kazuyoshi Tsutsui¹ (¹Department of Biology, Waseda University, ²Experimental Animal Science, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University)

I-4 The role of the ventromedial hypothalamic nucleus in chick on feeding regulation by blood glucose level.

○Tomoharu Nakamori¹, Ryo Nagashima², Hiroko Ohki-Hamazaki³ and Katsushige Sato⁴ (¹Department of Anatomy, Kitasato University, ²Division of Cell Biology, Kitasato University, ³Department of Health and Nutrition Sciences, Komazawa Women's University, ⁴Division of Biology, Kitasato University)

I-5 Effects of a neuropeptide derived from a novel gene in the chicken hypothalamus on feeding behavior and growth.

○Shusuke Taniuchi¹, Eiko Iwakoshi-Ukena¹, Yuki Bessho¹, Megumi Furumitsu¹, Tetsuya Tachibana² and Kazuyoshi Ukena¹ (¹Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, ²Faculty of Agriculture, Ehime University)

SESSION II (14:45-15:00)

II-1 Morphological analysis of newly identified neuropeptidergic cells in the chicken.

○Yuki Bessho¹, Eiko Iwakoshi-Ukena¹, Shusuke Taniuchi¹, Sho Maejima¹, Megumi Furumitsu¹, Tetsuya Tachibana² and Kazuyoshi Ukena¹ (¹Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, ²Faculty of Agriculture, Ehime University)

Coffee Break (15:00-15:15)

SPECIAL LECTURES (15:15-16:55)

SL-1 Role of the brain in sexual differentiation in chicken.

○¹Hiroko Ohki-Hamazaki and ²Fumihiko Maekawa (¹College of Liberal Arts and Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, ²Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies)

SL-2 Metabolism of carbohydrates: Relationship between energy production and protein modification.

○Ryoji Nagai (Laboratory of Food and Regulation Biology Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University)

November 22

SESSION III (9:30-11:00)

III-1 The study of glucose sensitivity on chick feed regulation and energy metabolism.

○Jun-ichi Shiraishi^{1,3}, Toshihisa Sugino², Takashi Bungo^{2,3}, Yoshiyuki Ohta¹ and Hiroko Ohki-Hamazaki^{3,4} (¹Department of Animal Science, Nippon Veterinary and Life Science University, ² Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, ³ Japanese Avian Bioresource Project Research Center, Hiroshima University, ⁴ College

of Liberal Arts and Sciences, Kitasato University)

III-2 Reproductive Cycle of captive female Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*).

Ken Nakamura^{1*}, Tomohiro Noshita^{1*}, Megu Kurose^{1*}, Yukihiro Takahashi², Fumie Saitoh², Junko Ishii^{2*,3**}, Saori Yamamoto⁴, Satoshi Kusuda⁴ and ○Hiroshi Ogawa¹ (¹Tokyo University of Agriculture, ²Ueno Zoological Gardens; ³Wildlife Conservation Center, Tama Zoological Park, ⁴Faculty of Applied Biological Science, Gifu University, *Former affiliation, **Present affiliation)

III-3 Effects of melanin and estradiol on the expression of *NLRC5* in the oviduct of laying and molting hens.

○Ahmad Mohammad Abdel-Mageed^{1,2}, Naoki Isobe¹ and Yukinori Yoshimura¹. (¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, ²Faculty of Science, Minia University, Egypt.)

III-4 Biosynthesis and biological action of pineal neurosteroids in birds.

○Kazuyoshi Tsutsui and Shogo Haraguchi (Department of Biology, Waseda University)

III-5 Sperm inactivation factor in the sperm storage tubules of Japanese quail.

○Tomohiro Sasanami, Mei Matsuzaki, Gen Hiyama and Shusei Mizushima (Graduate School of Agriculture, Shizuoka University)

III-6 Specificity of avian species in gastrointestinal motility stimulating action of ghrelin:

In vitro study using isolated muscle strips.

○¹Takio Kitazawa¹, Hiroki Teraoka¹ and Hiroyuki Kaiya² (¹Rakuno Gakuen University, ²National Cerebral and Cardiovascular Research Institute)

Closing of the Meeting (- 12:00)

MEMO

I-1 ジュウシマツの複雑なさえずりの進化における コルチコステロンの機能と神経機構

○鈴木研太^{1,2,4}、松永英治¹、山田裕子^{1,5}、池淵万季^{1,4}、水原誠子^{1,7}、
小林哲也³、飯郷雅之^{2,6}、岡ノ谷一夫^{1,3,7}

(¹理研 BSI、²宇都宮大 CORE、³埼玉大・理、⁴JST-ERATO、⁵東京海洋大・
海洋科学、⁶宇都宮大・農、⁷東大・総合文化)

【目的】

鳥のさえずり（歌）はヒナの時期に父親の歌を聴き、練習することによって獲得される学習形質であり、獲得された歌はメスへの求愛に用いられる。ジュウシマツは東南アジアに生息する野生のコシジロキンパラから家禽化された鳥であるが、ジュウシマツの歌は、音が大きく、目立つ音が多く使われており、音の系列の並びが非常に複雑であることが明らかとなっている(Honda and Okanoya, 1999)。一方、野生種のコシジロキンパラの歌は音が小さく、雑音的な目立たない音が多く使われており、系列は非常に単純である（図 1）。歌の特徴から、コシジロキンパラの歌は、野生下において生存に有利な特徴を有していることがわかる。一方、ジュウシマツの歌は、敵に見つかりやすいが、メスに好まれるような繁殖に有利な形質を有しており、家禽化によって、捕食のリスクといった野外環境における淘汰圧からの解放が、繁殖に有利な形質を進化させた一因ではないかと考えることができる。本研究では、適応の観点から、コンディション依存的に形質の発達を調節し、その進化に関わると考えられるホルモンとして、コルチコステロンに焦点を当て、その機能と神経機構から、ジュウシマツの複雑な歌の進化について考察したい。

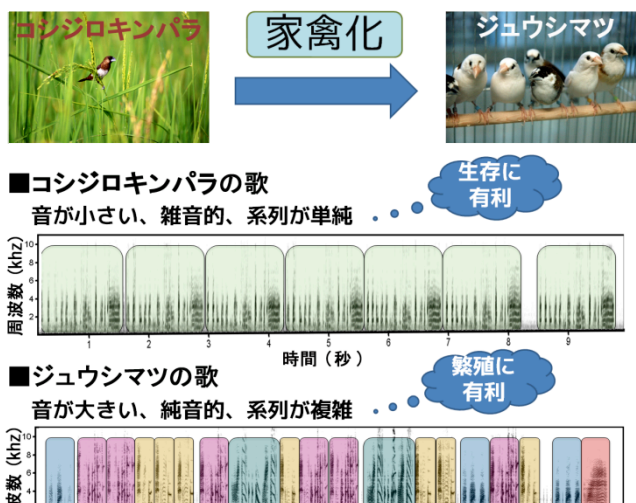


図 1 . ジュウシマツとコシジロキンパラの歌の特徴の違い

【材料と方法】

ジュウシマツとコシジロキンパラの糞中コルチコステロンレベルを幼鳥と成鳥について調べ、比較を行った。コルチコステロンはその受容体に作用して機能するため、ジュウシマツの脳内において、コルチコステロンが低濃度で結合するミネラルコルチコイド受容体 (MR) と高濃度で結合するグルココルチコイド受容体 (GR) の 2 種類の受容体遺伝子の脳内発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。また、ジュウシマツは家禽化によって、捕食の危険性が大きく減少したことなどから、恐怖・防御反応などにも変化が生じていると考えられるため、①新奇物体に対する反応、②拘束による持続性不動状態 (死んだふり反応) の持続時間、③棒に対する咬み付き反応について調べた。

【結果と考察】

幼鳥と成鳥においてジュウシマツの cortisol コルチコステロンレベルは、コシジロキンパラよりも有意に低かった (Suzuki *et al.*, 2012)。脳内の受容体は、歌の学習と制御に関わる神経核と、扁桃体を含む情動に関わる神経核の両方に発現が確認された (図 2、Suzuki *et al.*, 2011)。

ケージの餌入れに今までに見た事のない新奇物体を入れて、餌を食べるまでにかかった時間を計測した結果、ジュウシマツはすぐに食べに来るのに対して、コシジロキンパラはほとんど食べにくることはなかった。また、人為的に鳥を仰向けにしてしばらく上から押さえつけると硬直して動かなくなる持続性不動状態 (死んだふり反応) が生じるが、ジュウシマツは、硬直している時間が短いのに対して、コシジロキンパラは長時間硬直したままであった (図 3、Suzuki *et al.*, 2013)。さらに、細長い板状のセンサーを鳥の口元に近づけた結果、コシジロキンパラは咬みつき反応が多く、力が強いのにに対し、ジュウシマツでは咬みつき反応が少なく、力も弱かった。したがって、ジュウシマツは家禽化によって、恐怖・防御反応が減弱していると考えられる。

高レベルのコルチコステロンは扁桃体の機能を増強し、恐怖・防御反応を増加させるが、その一方で、歌神経核の発達を抑制し、歌の複雑さを減少させる (Mitra and Sapolsky, 2008; Buchanan *et al.*, 2004)。したがってジュウシマツは家禽化によりコルチコステロンのレベルを低いレベルに保つことで、恐怖・防御反応を低減するのと引き換えに歌神経系の発達を促進させ、複雑な歌をうたうことができるようになったのではないだろうか。

【参考文献】

- Honda E and Okanoya K (1999). *Zoological Science*, **16**(2): 319-326.
 Suzuki K, Yamada H, Kobayashi T, Okanoya K (2012). *Journal of Experimental Zoology A*, **317** (9): 561-570.
 Suzuki K, Matsunaga E, Kobayashi T, Okanoya K (2011). *Neuroscience*, **194**: 72-83.
 Suzuki K, Ikebuchi M, Okanoya K (2013). *Behavioral Processes*, **100**: 58-63.
 Mitra R, Sapolsky RM (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**: 5573-5578.
 Buchanan KL, Leitner S, Spencer KA, Goldsmith AR, Catchpole CK (2004). *Proc. R. Soc. B*, **271**: 2381-2386 (2004).

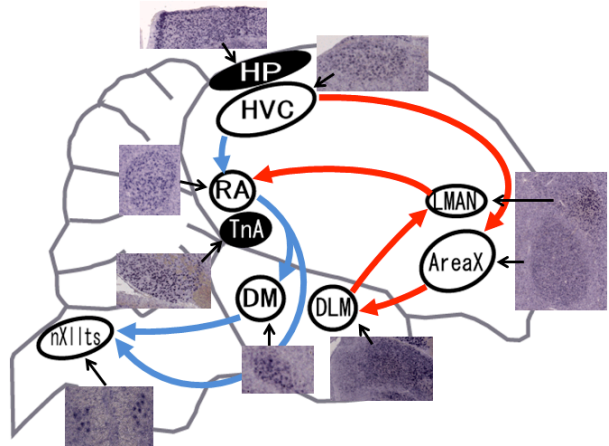


図 2. ジュウシマツ脳内における

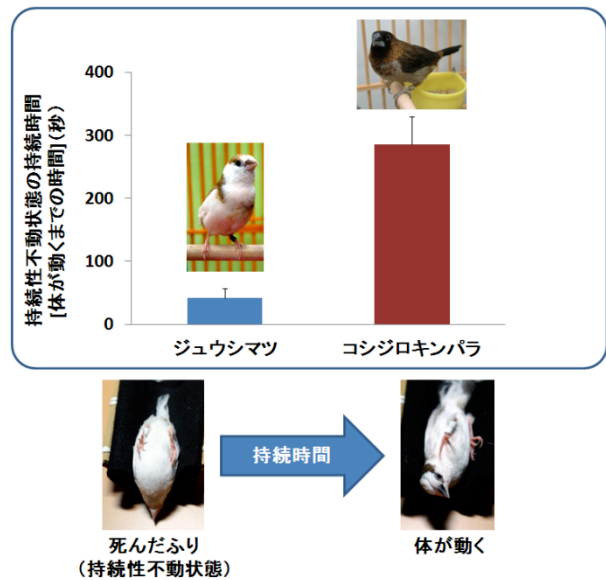


図 3. 持続性不動状態の持続時間

I-2 ニワトリ卵管における細胞傷害性細胞分布と関連遺伝子の発現に及ぼす伝染性気管支炎 (IB) ウイルス抗原刺激の影響

○ 新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
(広島大学 大学院生物圏科学研究科)

【目的】

IB ウイルスがニワトリ卵管に感染すると、卵殻形成異常などの障害が引き起こされる(1)。ウイルス感染初期にはナチュラルキラー (NK) 細胞などの細胞傷害性細胞による細胞性免疫が働く。一般的に卵管の局所免疫機能は、休産期に性ホルモンの減少に伴って低下すると考えられているが(2)、ウイルスに対する免疫応答が産卵状態やホルモンの影響を受ける可能性については不明である。CD8⁺細胞は細胞傷害性細胞ファミリーの一員で、TCR- $\gamma\delta$ ⁺T 細胞は CD8⁺細胞の一種である。CXCL12 と CX3CL1 は T 細胞や細胞傷害性細胞を誘導するケモカインで、IFN- γ は NK 細胞を活性化させ、NK 細胞自身も産生するサイトカインである。グランザイムとパーフォリンは細胞傷害性細胞が産生する細胞障害タンパクである。また、B-NK は NK 細胞に発現している抑制性受容体である。そこで、本実験では性ホルモン刺激がウイルス抗原に対する卵管粘膜の細胞傷害性細胞の誘導能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。抗原には野生型の IB ウイルスの代用として、IB ウイルス弱毒化ワクチン (aIBV) を用いた。

【方法】

約 260 日齢の白色レグホンを、産卵鶏と休産鶏、コーン油またはエストラジオールベンゾエイト (EB) 投与休産鶏 (オイル鶏と EB 鶏) に分けた。休産鶏は 1 日 25g の制限給餌による誘導換羽処理した。オイル鶏と EB 鶏には休産処理の 3 週間目から 100 μ l のコーン油または EB 液を 7 日間筋注投与した。次に各処理区の供試鶏を aIBV 区と対照区に分け (各区 5 羽)、開腹手術を行い、卵管膨大部内へ aIBV 溶液またはその溶媒を投与した (推定卵管重量 1 g あたり 25 μ l)。その 24 時間後に卵管峡部と子宮部を採材した。得られた卵管の峡部および子宮部から凍結切片を作製し、マウス抗ニワトリ CD8 または TCR- $\gamma\delta$ 抗体を用いてアビジン・ビオチン法で酵素免疫染色した。粘膜固有層における陽性細胞の分布(個/ $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) を顕微鏡画像解析した。また、粘膜からは RNA を抽出し、DNase 処理を行った後、cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法により CXCL12、CX3CL1、IFN- γ 、B-NK、パーフォリンおよびグランザイムの mRNA 発現を解析した。

【結果】

産卵期の峡部では粘膜固有層中の CD8⁺ 細胞および TCR- $\gamma\delta$ ⁺細胞の分布と、上皮細胞間の CD8⁺細胞分布は、aIBV 区で対照区と比べ産卵鶏では有意に多かったが

($P < 0.01$)、休産鶏およびオイル鶏では有意な変動を示さなかった (図 1)。しかし、EB 鶏ではいずれの細胞も aIBV 区で有意に多かった ($P < 0.05$)。産卵鶏の子宮部では aIBV 区で対照区と比べ、固有層中と上皮細胞間で $CD8^+$ 細胞数が高い値を示し ($P < 0.05$)、固有層中では $TCR-\gamma\delta^+$ T 細胞分布も有意に増加したが ($P < 0.01$)、休産鶏ではどちらの細胞も有意な変動は認められなかった。しかし、EB 鶏の固有層中では $CD8^+$ 細胞が aIBV 区で対照区と比べ高い値を示した ($P < 0.01$)。

産卵鶏の峡部では aIBV 投与により *CXCL12*、*CX3CL1*、*IFN- γ* 、*B-NK*、グランザイムおよびパーフォリンの遺伝子発現は増加したが ($P < 0.05$)、休産鶏およびオイル鶏ではいずれの遺伝子も aIBV 投与に伴う有意な変動を示さなかった (図 2)。しかし、EB 鶏では aIBV 刺激によって、これらの遺伝子発現は有意に増加した ($P < 0.01$)。産卵鶏の子宮部ではこれらの遺伝子は抗原刺激に対して有意に増加したが、休産鶏とオイル鶏では変動を示さず、EB 鶏では *CX3CL1* および *IFN- γ* が増加した ($P < 0.05$)。

以上のことから、卵管では IB ウイルスに対して細胞傷害性細胞の動員による免疫応答が働き、この応答は産卵期に比べて休産期には低下するが、EB 刺激により回復する可能性が示された。このことから、休産期における免疫応答の低下には、エストロゲン量の減少が 1 つの要因として関わりと推定される。

組織	処理	粘膜固有層中		上皮細胞間	
		CD8	TCR- $\gamma\delta$	CD8	TCR- $\gamma\delta$
峡部	産卵鶏	**	**	**	ND
	休産鶏	ND	ND	ND	ND
	オイル鶏	ND	ND	ND	ND
	EB鶏	**	*	**	ND
子宮部	産卵鶏	**	**	*	ND
	休産鶏	ND	ND	ND	ND
	オイル鶏	ND	ND	ND	ND
	EB鶏	*	ND	ND	ND

図 1. 産卵鶏、休産鶏、オイル鶏および EB 鶏における卵管峡部と子宮部の細胞傷害性細胞分布に及ぼす aIBV 刺激の影響

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ND : 有意差なし

組織	処理	<i>CXCL12</i>	<i>CX3CL1</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>B-NK</i>	グランザイム	パーフォリン
峡部	産卵鶏	**	**	**	*	**	**
	休産鶏	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	オイル鶏	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EB鶏	**	**	**	**	**	**
子宮部	産卵鶏	**	*	*	*	**	*
	休産鶏	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	オイル鶏	ND	ND	*	ND	ND	ND
	EB鶏	ND	*	*	ND	ND	ND

図 2. 産卵鶏、休産鶏、オイル鶏および EB 鶏における卵管峡部と子宮部の細胞傷害性免疫関連遺伝子に及ぼす aIBV 刺激の影響

【参考文献】

- (1) Feberwee A and Landman WJ. (2010) Avian Pathol 39: 133-7.
- (2) Kretzschmar-McCluskey, V. et al. (2008) Poultry Sci 87: 2146-2151.

I-3 生殖生理と生殖行動を変化させる社会的刺激受容の神経内分泌機構

○戸張靖子¹、ソンユリ¹、産賀崇由¹、長谷川喜久²、筒井和義¹
(¹早稲田大・教育総合科学・統合脳科学 ²北里大・獣医学・実験動物学)

【背景と目的】

動物は外界からの入力に対して常に一定した応答を示すのではなく、環境の変化を的確に受け止め、これに対して適応的に柔軟な応答をする能力を備えている。社会的隔離、同種他個体の存在といった社会的な情報は、感覚系で受容されたあと脳内で処理されて、神経系や内分泌系に変化をもたらして個体の生理状態を調節する。社会環境変化の受容系と行動・内分泌的適応の仲介をする重要な役割を演じている脳内分子の1つがペプチドホルモンであると考えられているが、その詳細は不明である。

脊椎動物の生殖は、神経系と内分泌系が協調して作る視床下部-下垂体-生殖腺(HPG)軸と呼ばれるシステムによって調節されている。つまり、視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(gonadotropin-releasing hormone; GnRH)が分泌され、GnRHの作用により脳下垂体から生殖腺刺激ホルモンが、そして生殖腺刺激ホルモンにより生殖腺から性ステロイドホルモンが分泌される。2000年に、筒井らのグループは生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する新規の脳ホルモンを鳥類のウズラの視床下部から発見して、生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(gonadotropin-inhibitory hormone; GnIH)と名付けた[1]。GnIHニューロンは視床下部の室傍核に存在し、神経線維は正中隆起に終末している。ノルエピネフリン(norepinephrine; NE)、ドーパミン(dopamine; DA)やセロトニン(serotonin)などのモノアミン類も社会的な情報を個体の生殖機能に仲介する役割を担っていると考えられており、特に社会的相互作用中の視覚刺激はモノアミンの活性を変化させることが報告されている[2-4]。

雄ウズラは、雌の存在を認知すると瞬時に性行動を誘発する[5]。また、雌の存在により瞬時に血中のテストステロン濃度が減少することが報告されている[6]。

以上の背景のもと、雌の存在が雄ウズラのGnRHやGnIHなどのペプチドホルモンやNEやDAなどのモノアミン類を変化させることによって、HPG軸を調節して個体の生理状態と生殖行動を変化させるという仮説をたて、以下の実験を行った。

【方法と結果】

(1) 雌の存在が雄ウズラの HPG 軸と生殖行動に及ぼす影響

雄ウズラを異なる3つの社会環境下 [(i) 同種他個体から隔離(対照群) (ii) 雌個体を提示(接触なし) (iii) 雄個体を提示(接触なし)] に1時間置き、間脳におけるGnIHとGnRHの遺伝子発現、血中の黄体形成ホルモン(luteinizing hormone; LH)とテストステロンの濃度を測定した。その結果、雌の存在に反応してGnIH遺伝子の発現が増加した。一方、GnRH遺伝子の発現量は異なる社会環境間で変化がなかった。さらに、雌を提示された雄ウズラのLHとテストステロン血中濃度は、対照群と比較して有意に低下した。行動解析では、雌を提示された雄は、雌を引き付けるための発声行動(Crow)の頻度を下げ、雌のそばにいる時間が長くなった。

(2) 雌の存在が雄ウズラの間脳モノアミンレベルに及ぼす影響

雄ウズラを (i) 同種他個体から隔離 (対照群) (ii) 雌個体を提示 (接触なし) の社会環境下に 1 時間置き、間脳におけるモノアミンの濃度を測定した。雌を提示された雄ウズラの間脳内 NE 濃度は、対照群と比較して有意に低下した。その他のモノアミン、代謝物、それらの存在比に有意な差はみられなかった。

上記の結果から、NEがGnIHの上位でGnIHの発現を抑制的に制御しているという仮説をたてた。

(3) NE による GnIH 遺伝子発現の制御

NE神経に選択的に作用する神経毒DSP-4を雄ウズラの腹腔内に投与して、間脳のNEを減少させるとGnIH遺伝子の発現が増加し、NEを脳室内投与するとGnIH遺伝子の発現が減少した。さらに、NEによるGnIH発現の制御が直接的なものかどうかを形態学的に検討した。GnIHニューロンはNEニューロンの投射を受け、NE受容体 $\alpha 2A$ 型のmRNAを発現していた。

【考察】

本研究により、雌の存在が雄のNE-GnIH系を変化させて血中のLHやテストステロン濃度を減少させることが示唆された。なぜウズラは雌を認知すると血中テストステロンレベルが減少するのだろうか？ Crowは、雄性ホルモン依存的な発声である。雌が不在のときの雄は、雌を引き付けるためにCrowを発するが、いったん雌が目の前に現れるとCrowを発する必要がなくなり、目の前の特定の雌へ交尾をするために近づいて行くと考えられる。雌の認知によるテストステロンの急速な減少は、上記のような行動のスイッチングに関わっていると推測するが、さらに詳細な解析が必要である。

【参考文献】

- [1] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661-667.
- [2] Fuchs E, Kramer M, Hermes B, Netter P, Hiemke C (1996) Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacol Biochem Behav* 54:219-228.
- [3] Korzan WJ, Summers TR, Summers CH (2000) Monoaminergic activities of limbic regions are elevated during aggression: influence of sympathetic social signaling. *Brain Res* 870:170-178.
- [4] Cornil CA, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z, Baillien M, Dejace C, Ball GF, Balthazart J (2005) Rapid decreases in preoptic aromatase activity and brain monoamine concentrations after engaging in male sexual behavior. *Endocrinology* 146:3809-3820.
- [5] Ball GF, Balthazart J (2010) Japanese quail as a model system for studying the neuroendocrine control of reproductive and social behaviors. *ILAR J* 51:310-325.
- [6] Cornil CA, Stevenson TJ, Ball GF (2009) Are rapid changes in gonadal testosterone release involved in the fast modulation of brain estrogen effects? *Gen Comp Endocrinol* 163:298-305.

【謝辞】

本研究は「2011年度 (第28回) 守谷育英会研究助成金」「科学研究費補助金 (22700446, 18107002)」の助成を受けた。

I-4 血糖値上昇に伴う摂食抑制機構における視床下部腹内側核の役割

○中森智啓¹、長嶋亮²、浜崎浩子³、佐藤勝重⁴

(¹北里大・医、²北里大・理、³北里大・一般教育、⁴駒沢女子大・人間健康学)

【研究の背景・目的】

摂食行動の制御には視床下部の神経細胞が重要な働きをしていることが知られている。視床下部腹内側核(nucleus ventromedialis hypothalami : VMH)を破壊することによって過食による肥満が引き起こされ、逆に VMH に刺激を加えると摂食が抑制される(Hetherington *et al.*, 1940)。このことから、VMHは満腹中枢と呼ばれている。VMHから様々な脳領域へ神経の投射があり(Saper *et al.*, 1976)、VMHの神経活動は摂食抑制の働きを持つペプチドの発現・放出を亢進し、満腹感を作り出していると考えられている。VMHの神経細胞の活動性は、血糖値の上昇によって高まることが知られている(Mayer, 1955)が、そのメカニズムについては未解明な点が多く残っている。本研究は、血糖値の変動がVMHの神経細胞の活動をどのように制御し、満腹感を作り出しているのかを明らかにすることを目的としている。

【結果・考察】

まず、グルコース濃度の変化がVMHの神経細胞の活動に与える影響を調べた。孵化後7日齢のニワトリヒナの急性脳スライスを作成し、VMHに投射する弓状核の細胞に電気刺激を与えた時のVMHの神経細胞の応答を、光学的イメージング法を用いて記録した。その結果、還流液中のグルコース濃度の上昇によってVMHの神経細胞の活動性が高まることが分かった。この変化は、グルコーストランスポーター(GLUT)の全てのサブタイプを非選択的に阻害する薬剤(GLUT阻害剤)や、GLUT1を選択的に阻害する薬剤の付加によって起こらなくなった。このことから、GLUT1を介したグルコースの取り込みが、VMHの神経細胞の賦活化を引き起こしていると考えられた。

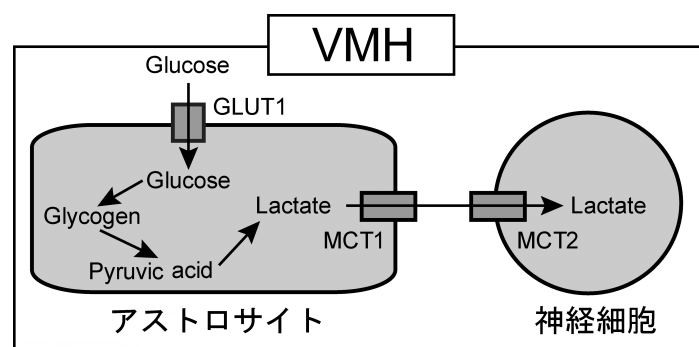
次に、ニワトリヒナにおけるGLUT1を介したグルコースの取り込みによる摂食行動の変化を調べた。両側のVMH領域に先端が達するようにカニューレを挿入して固定し、VMHにほぼ限局したグルコースや薬剤の投与を可能にした。7日齢のヒナを4時間絶食させた後、グルコース液かsalineをVMHに投与し、1時間餌を与えたときの摂食量を計測した。グルコース投与群はsaline投与群に比べて摂食量が減少し、一方でGLUT阻害剤やGLUT1の阻害剤を投与した群では、摂食量が増加した。このことは、VMHの細胞がGLUT1を介して細胞外グルコースの上昇を感知することで、摂食の抑制が起こることを示していた。

VMH領域において組織学的な解析を行った結果、GLUT1 mRNAを発現している細胞は、アストロサイト(グリア細胞の1種)のマーカであるGFAPを発現しており、VMHに存在するアストロサイトはGLUT1を持つことが示唆された。また、VMH領域ではGLUT1の他にGLUT3の発現も確認できたが、GLUT3 mRNAは神経細胞のマーカであるNeuNも発現していたことから、GLUT3は神経細胞に発現していることが示唆された。これらの結果は、VMHの神経細胞の賦活化や摂食行動の抑制は、GLUT1を介したアストロサイトへのグル

コースの取り込み、あるいは GLUT3 を介した神経細胞へのグルコースの取り込みが引き金となっていることを示唆していた。アストロサイトへのグルコース取り込みが関与する場合には、細胞外グルコース量の上昇に伴う何らかのシグナルがアストロサイトから神経細胞へと伝わっていると考えられた。

アストロサイトでは、グルコースからの乳酸合成が起ることが知られている。そのため、アストロサイトから神経細胞への細胞外グルコース量上昇のシグナル伝達を担う物質の候補の1つとして、乳酸が考えられた。乳酸の細胞内への取り込みおよび細胞外への放出は、モノカルボン酸輸送担体(MCT)を介して行われる。そこで、VMH の神経細胞の活動性や摂食行動の調節に、アストロサイトから放出される乳酸がどのように関わっているのかを調べた。

まず、VMH における MCT のサブタイプの発現を調べたところ、MCT1 がアストロサイトに、MCT2 が神経細胞に発現していた。また、乳酸の濃度上昇に伴い VMH の神経細胞の活動性が高まることが光学的イメージングで示された。MCT1 の阻害剤を付加した場合、グルコース投与による神経細胞の賦活化は阻害されたが、乳酸投与では活動性が上昇した。一方、MCT2 の阻害剤を付加したところ、グルコース・乳酸のどちらを投与した場合でも、神経細胞の活動性の変化は見られなかった。さらに、ニワトリヒナを用いて VMH での乳酸による摂食調節について調べた。4時間の断食後に乳酸を VMH に投与した群では saline 投与群に比べて、投与後1時間の摂食量が減少し、MCT1 または MCT2 の阻害剤を VMH に投与した群では投与後1時間の摂食量が増加していた。これらの結果から、MCT1 および MCT2 を介したアストロサイトから神経細胞への乳酸の伝達が、VMH の神経細胞の賦活化や摂食抑制において重要であることが分かった。



【まとめ】

VMH 領域のアストロサイトが GLUT1 を介して細胞外グルコース濃度の上昇を感知しており、その情報はアストロサイトから神経細胞へと乳酸によって伝えられている。この際、乳酸のアストロサイトからの放出と神経細胞への取り込みには MCT1 と MCT2 がそれぞれ使われている。MCT2 を介して乳酸が VMH の神経細胞に取り込まれると、細胞の活動性が上昇する。その結果、VMH の神経細胞や VMH から神経投射を受けている細胞において、摂食抑制に作用するペプチド等の産生や分泌が亢進され、摂食抑制が起こっていると考えられる。今後は、VMH の神経細胞が産生しているペプチド等の種類や、摂食に伴うその産生・放出量の変化を調べていく予定である。

I-5 ニワトリの視床下部で見つけた神経ペプチドが 摂食行動と成長に与える影響

○谷内秀輔¹、岩越-浮穴栄子¹、別所裕紀¹、古満芽久美¹
橘 哲也²、浮穴和義¹
(¹広島大・院総科・脳科学、²愛媛大・農・畜産)

【目的】

我々は、摂食行動を制御する未知のペプチド探索を目的とし、ニワトリの摂食中枢が存在する視床下部の漏斗部に特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、既知のペプチドとは全く相同性のない新規神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードする *N1* (コードネーム) 遺伝子を見つけている。*N1* 遺伝子にはパラログが存在しており、そのパラログを *N1-like* 遺伝子と呼んでいる。この *N1* と *N1-like* 遺伝子のホモログは円口類以降の幅広い脊椎動物においてゲノムレベルで保存されており、これらの新規遺伝子は脊椎動物の生命活動に重要な役割を果たしている可能性がある。

N1 と *N1-like* 遺伝子がニワトリの摂食行動に関与する可能性を検討するため、絶食させたニワトリ雛の視床下部の漏斗部における *N1* 遺伝子と *N1-like* 遺伝子の mRNA 発現量を解析した。絶食させたニワトリ雛の漏斗部において、*N1* 遺伝子の mRNA 発現量は変化しなかったが、*N1-like* 遺伝子の mRNA 発現量は有意に増加していた。このことは、*N1-like* 遺伝子が摂食行動に関与する可能性を示唆した。

そこで、本研究では、*N1-like* 遺伝子からつくられる *N1-like* ペプチドの摂食行動を含むエネルギーホメオスタシスや成長への影響の解明を目的として、*N1-like* ペプチド産生細胞の形態学的解析および生体内への *N1-like* ペプチド投与による摂食行動と体重増加への影響を調べた。

【方法】

実験 1. ニワトリ雛の脳における *N1-like* ペプチド産生細胞の組織化学的解析

1 日齢のニワトリ雛の脳を 4%PFA を用いて 4°C で一晩固定し、30%スクロースに置換した後に凍結切片を作製した。*in situ* hybridization 法は、Digoxigenin (DIG) 標識した *N1-like* 特異的 cRNA プローブを用いて行い、抗 DIG アルカリフォスファターゼ抗体と NBT/BCIP を用いて検出した。免疫染色は、抗ニワトリ *N1-like* ペプチド抗体と VECTASTAIN Elite ABC Kit を用い、DAB で検出した。

実験 2. ニワトリ雛への脳室内単回投与が摂食行動に与える影響の解析

大腸菌組換えタンパク質発現系を用いて産出した *N1-like* ペプチドを 5 日齢のニワトリ雛の脳室内に単回投与し、摂食量を測定した。コントロール群には、溶媒のみを投与した。

実験 3. ニワトリ雛への皮下慢性投与が成長に与える影響の解析

9日齢のニワトリ雛の皮下に浸透圧ポンプ（ALZET社，2001，7日間投与用）を埋込み，N1-like ペプチドを7日間慢性投与し，成長への影響を解析した。成長は手術日以降の体重増加量を指標として解析を行った。また，下垂体から Total RNA を抽出し，逆転写反応を行った後に，成長ホルモン（GH），プロラクチン（PRL），甲状腺刺激ホルモンβサブユニット（TSHβ），プロオピオメラノコルチン（POMC）の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって解析した。

【結果および考察】

in situ hybridization 法および免疫染色法により，N1-like ペプチド産生細胞の局在を解析した結果，N1-like ペプチド産生細胞は，視床下部の漏斗核と乳頭体核に局在していた。漏斗核は鳥類の摂食制御に関与する神経核であることから，N1-like ペプチドは摂食行動を制御する可能性が形態学的にも示唆された。鳥類の乳頭体核の詳細な機能については不明な点が多いため，乳頭体核に局在する N1-like ペプチド産生細胞の役割は現時点では不明である。また，N1-like ペプチド産生細胞の神経線維は，正中隆起に密に投射していた。神経線維の正中隆起への投射は，N1-like ペプチドが視床下部と下垂体を結ぶ血管系である下垂体門脈に分泌される可能性を示唆した。このことは，N1-like ペプチドが下垂体前葉ホルモンの産生を制御する可能性がある。

さらに，N1-like ペプチドがニワトリの摂食行動に与える影響を検討することを目的とし，N1-like ペプチドをニワトリ雛の脳室内に単回投与した。N1-like ペプチドの脳室内単回投与によって，摂食量は有意に抑制された。

N1-like ペプチド産生細胞の神経線維が正中隆起に投射していたことから，N1-like ペプチドは血流を介して作用する可能性が示唆された。つまり，末梢からの投与によって N1-like ペプチドが生理作用を示す可能性が示された。そこで，N1-like ペプチドの成長に与える影響を解析することを目的として，N1-like ペプチドを皮下に慢性投与した。その結果，N1-like ペプチドを皮下に慢性投与したニワトリ雛の体重増加量が有意に増加した。つまり，N1-like ペプチドはニワトリ雛に対して成長促進作用を示した。なお，皮下慢性投与は集団飼育環境下で行ったため，摂食量への影響は不明であった。また，成長促進作用に下垂体ホルモンが関係するか否かを検討することを目的とし，下垂体における GH，PRL，TSHβ，POMC の mRNA 発現量を解析したが，N1-like ペプチド投与群とコントロール群との間に有意な変化はなかった。しかし，本研究で用いた浸透圧ポンプが7日間用であることから，サンプリング時にはポンプ内のペプチドが枯渇していたために，下垂体機能への影響が観察できなかった可能性も考えられる。

以上の結果から，N1-like ペプチドは摂食行動等のエネルギーホメオスタシスおよび成長に関与する可能性が示唆された。

II-1 ニワトリで発見した神経ペプチド産生細胞の形態学的解析

○別所裕紀¹、岩越-浮穴栄子¹、谷内秀輔¹、前嶋 翔¹、古満芽久美¹
橘 哲也²、浮穴和義¹
(¹広島大・院総科・脳科学、²愛媛大・農・畜産)

【目的】

我々はニワトリの視床下部漏斗部から、新規神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードしていると推測される 2 種類の新規遺伝子（コードネーム *N1* 及び *N1-like*）を発見している。それら新規遺伝子の mRNA 発現細胞は視床下部漏斗部内の乳頭体核及び漏斗核に局在することが明らかとなっているが、発達段階での発現変動や他の既知因子との相関は調べられていない。そこで本研究では、より詳細な形態学的解析を行うことを目的とした。まず、実験 1 として 2 種類の新規遺伝子 mRNA の発達段階における発現量と発現細胞のシグナルの変化を解析した。

なお、新規遺伝子は哺乳類にも存在しており、ラットを用いた先行研究においては、新規遺伝子の翻訳産物である新規神経ペプチド (*N1* ペプチド及び *N1-like* ペプチド) の産生細胞はヒスタミンニューロンの近傍に局在していることが明らかとなっている。このことより、両細胞間において何らかの相互作用が示唆されているが、ニワトリにおいてはその関係は明らかとなっていない。そこで実験 2 では新規神経ペプチド産生細胞とヒスタミンニューロンの相関を解析した。

【方法】

実験 1. 2 種類の新規遺伝子 mRNA 発現細胞の発達段階における解析

まず、孵化後 1、8、15 日齢における視床下部漏斗部での mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

次に、孵化後 1 日齢と 15 日齢のニワトリ凍結脳切片を作製し、*in situ* hybridization 法によって、*N1* 及び *N1-like* mRNA 発現細胞を解析した。

実験 2. 新規神経ペプチド産生細胞とヒスタミンニューロンとの相関解析

ニワトリにおいては、ヒスタミンニューロンに関する報告はなく、その指標となるヒスタミン合成酵素の同定もされていなかった。そこで本研究では、ヒスタミン合成酵素の cDNA クローニング、培養細胞を用いたタンパク質発現及び活性検出、遺伝子発現解析を行いヒスタミン合成酵素の同定を行った。

続いて、2 種類の新規遺伝子のうちニワトリで解析が進んでいる *N1-like* とヒスタミン合成酵素との相関を解析した。両者の局在を解析するため、凍結脳切片を作製し、同一切片上においてヒスタミン合成酵素 mRNA 発現細胞を *in situ* hybridization 法、*N1-like* ペプチドを免疫組織化学的手法により検出した。次に、①系統間（卵用鶏と肉用鶏）、②48 時間絶食状態、③発達段階（孵化後 1、8、15 日齢）におけるヒスタ

ミン合成酵素と *N1-like* の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

【結果・考察】

実験 1. 2 種類の新規遺伝子 mRNA 発現細胞の発達段階における解析

まず、孵化後 1、8、15 日齢における視床下部漏斗部（乳頭体核と漏斗核を含む部位）の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法によって調べると、*N1* mRNA 発現量は、1 日齢よりも 8 及び 15 日齢で増加し、逆に *N1-like* mRNA 発現量は減少することが明らかとなった（図 1）。

次に、*N1* mRNA 発現細胞数及びシグナル強度は、乳頭体核においては 1 日齢よりも 15 日齢で増加していた（表 1）。漏斗核においては、1 日齢でほとんどシグナルは見られなかったが 15 日齢でシグナルが見られるようになった（表 1）。一方、*N1-like* mRNA 発現細胞数は、乳頭体核においては 1 日齢で多く、15 日齢で減少していた（表 1）。漏斗核においては、1 日齢で見られていたシグナルが 15 日齢では見られなかった（表 1）。

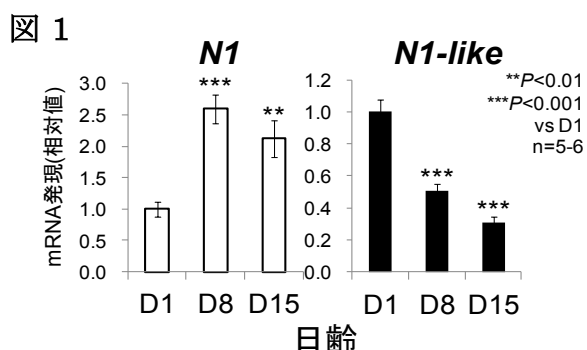


表 1

		1日齢	15日齢
<i>N1</i>	乳頭体核	+	++
	漏斗核	-	+
<i>N1-like</i>	乳頭体核	+++	+
	漏斗核	++	-

図 1. 発達段階における 2 種類の新規遺伝子 mRNA 発現量の変化

表 1. 2 種類の新規遺伝子 mRNA 発現細胞の発達段階におけるシグナルの変化

in situ hybridization での発現細胞数及びシグナルの強さを+で表す。

-はシグナルが見られなかったことを示す。

実験 2. 新規神経ペプチド産生細胞とヒスタミンニューロンとの相関解析

ニワトリ・ヒスタミン合成酵素 mRNA 発現細胞は視床下部漏斗部内の乳頭体核にのみ局在しており、そこでは *N1-like* ペプチド産生細胞と同一であった。

ヒスタミン合成酵素及び *N1-like* の mRNA 発現解析では、全ての条件で両者の mRNA 発現の挙動は類似しており、①（系統間）肉用鶏よりも卵用鶏で発現が高いこと、②（絶食状態）絶食負荷により発現が高くなること、③（発達段階）日齢が増すにつれて発現が低くなることが分かった。さらに、ニワトリヒナへの脳室内投与によって、ヒスタミン及び *N1-like* ペプチドはどちらも摂食行動を抑制することが明らかとなった。これらの解析から、ニワトリの脳においては、*N1-like* ペプチドはヒスタミンと同様の機能を持ち、協調して働いていることが示唆された。

○浜崎浩子¹、前川文彦²

(¹北里大学・一般教育部・医療系研究科、²(独) 国立環境研究所・環境健康研究センター)

有性生殖を行う高等動物では、生殖腺が雄では精巣、雌では卵巣に分化し、精子または卵の形成が起こる。減数分裂によって形成される生殖細胞は遺伝子の組み合わせが多様となり、さらに受精によって、新しい組み合わせの遺伝子をもった個体が生じる。これにより種の中の個体の多様性が保たれるため、種の保存という観点では、有性生殖は無性生殖には見られない利点を持つ。

さて、雄と雌が出会って卵の受精が起こるためには、的確に生殖行動が起こることが重要であり、これには個体レベルでの制御が必要であることはいうまでもない。これには、雄と雌それぞれが精巣あるいは卵巣を発達させることだけでは不十分であり、脳も雄化あるいは雌化することが必要である。この脳の性分化は、生殖腺から血中に分泌される性ホルモンが脳に作用して起こることが、多くの実験結果により示されている。すなわち、性染色体構成が雄では ZZ、雌では ZW である鳥類では、Z 染色体上にある DMRT1 遺伝子の発現量の違いのために、雄では精巣、雌では卵巣が分化する。そして、雌では胚時期から孵化期にかけて卵巣から分泌されるエストロジェンの影響を受けて、脳が雌化する。一方エストロジェンの影響を受けない雄では、脳が雄化することになる。ところが、これだけでは説明できない性分化の例が知られている。例えば、雄のみでさえずりが見られるゼブラフィンチでは、さえずりに重要な役割をもつ神経核が、雄では雌よりも大きいことが知られているが、体の左右で細胞構成がほぼ雄型 (ZZ) あるいは雌型 (ZW) に分かれている自然発生の雌雄同体ゼブラフィンチを調べると、個体のホルモン環境は同一であるにもかかわらず、左右の脳でこの神経核の大きさが異なっている。この結果は性ホルモン非依存性に脳の性分化が起こることを示唆している。そこでわれわれは、このような性ホルモン非依存的な性分化が、行動、生理、形態などのどのような側面で起こるのか、また、そのメカニズムはどのようなものかについて系統的、包括的に調べることを目的として、実験を行った。

実験では、生殖腺が分化するよりも前の時期である孵卵開始後 1.5 日目 (E1.5) のニワトリ胚を用いて、個体間で脳原基の交換移植を行うことにより、ニワトリの脳キメラを作製した。脳と体の性の組み合わせにより、脳が雌で体も雌 (FF キメラ)、あるいは体は雄 (FM キメラ) の個体、脳が雄で体は雌 (MF キメラ) あるいは体も雄 (MM キメラ) の個体、計 4 種類のキメラを解析した。なお、FM キメラでは、個体の性成熟に伴って移植組織の拒絶反応が起こったので、免疫抑制剤を投与して拒絶反

応を抑制することで観察を継続した。

表現型の観察と解析としては、オープンフィールドでの行動と性行動の観察、生殖機能の解析、内分泌機能の解析、脳の性的二型核の解析、さらに脳のニューロステロイドの解析を行った。

脳の「性別」が体の「性別」と異なることで影響を受けたのは、MF キメラにおける性成熟の時期と産卵数であった。すなわち体が雌であっても脳が雄由来であると、正常な雌で見られるような産卵周期を発現・維持できないことがわかった。また、脳のニューロステロイド濃度を調べると、成鳥や、孵化直前の E21 胚において、エストラジオールの濃度が雄の方が雌よりも高く、さらに E21 のキメラ胚の脳を調べると、MF キメラや MM キメラでは、FF キメラや FM キメラよりもエストラジオール濃度が高いという結果が得られた。これは、脳のニューロステロイド濃度は生殖腺からの性ホルモンの影響を受けないことを示しており、MF キメラで見られた表現型の発現と何らかの関連があることが示唆される興味深い結果であった。

なお、本研究は、広島大学の都築政起教授、豊後貴嗣教授、前田照夫教授、早稲田大学の筒井和義教授、東京医科歯科大学の田中光一教授、そして各研究室のメンバー、さらに他の先生方との共同研究によって実現したものです。ここに改めて感謝の意を表します。

【参考文献】

Maekawa F, Sakurai M, Yamashita Y, Tanaka K, Haraguchi S, Yamamoto K, Tsutsui K, Yoshioka H, Murakami S, Tadano R, Goto T, Shiraishi J, Tomonari K, Oka T, Ohara K, Maeda T, Bungo T, Tsudzuki M and Ohki-Hamazaki H. (2013) A genetically female brain is required for regular reproductive cycle in chicken brain chimeras. *Nat. Commun.*, 4: 1372.

永井竜児

(東海大学農学部バイオサイエンス学科食品生体調節学研究室)

近年、飽食および運動不足に起因する肥満が増加し、メタボリックシンドロームと呼ばれる代謝異常から糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病の発症が急増している。以前は、ある種の生活習慣病が進行して症状が現れてから「治療」することが主流であったが、最近では国民の健康に対する意識が高まり、病態に発展しつつある未病の状態を早期に見つけ、その進展を「予防」する食習慣が注目されている。我々は生活習慣病の予防ならびに加齢に伴う生理機能の低下を改善する目的で、化学的な翻訳後修飾反応の一つであるメイラード反応後期生成物(AGEs)の生成経路の解析および阻害化合物の探索を行ってきた。今回、糖質代謝とAGEs生成の関連、現状と今後の課題、食品素材を用いたAGEs生成抑制の可能性について紹介したい。

1. メイラード反応（糖化）とは

メイラード反応は発見者の名にちなんでメイラード反応、もしくは糖化反応(glycation)とも呼ばれ、大別するとアマドリ転位物が生成するまでの前期反応と、その後、酸化・脱水・縮合などの反応を経てAGEs(Advanced glycation End product)が生成する後期反応に分けられる(図1)。

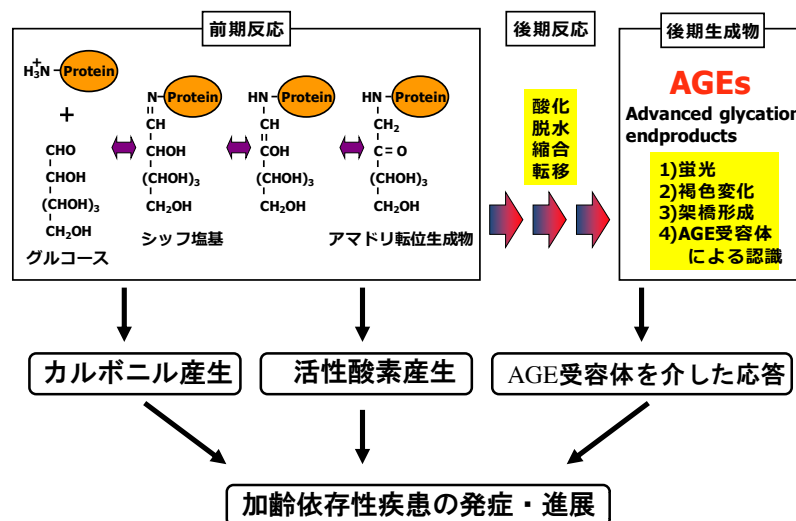


図1：メイラード反応

炭水化物は生命維持に不可欠な栄養素であるが、図1に示す通りグルコースやリボースなどの還元糖はカルボニル基を有するため、蛋白上で陽性荷電を有するリジン

やアルギニン残基を修飾して電荷を奪い、さらに架橋構造も形成するなど、生体において酵素蛋白の活性や構造蛋白の立体構造に多大な影響を及ぼすことが知られている（図2）。

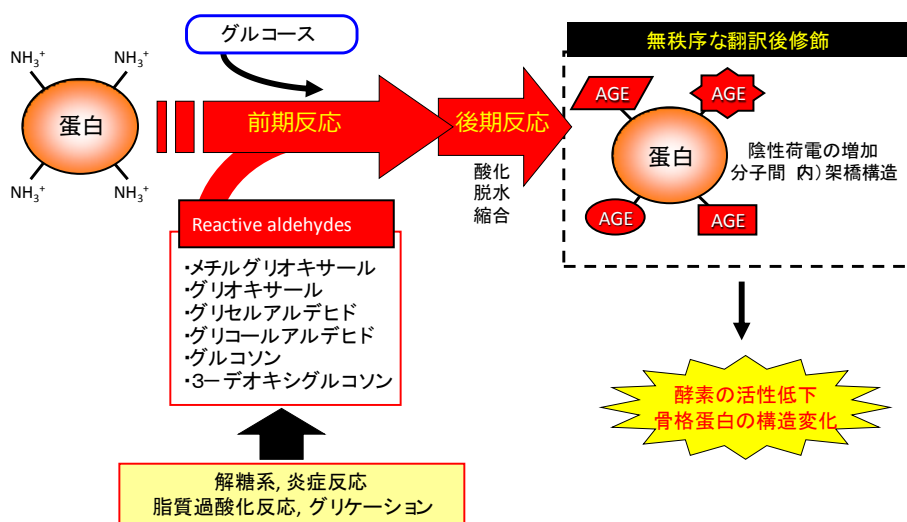


図2：メイラード反応に伴う蛋白の変性

当初、メイラード反応は食品の加工、貯蔵する際に起こる褐変および栄養価の変化に関する反応として発見され、食品化学者の間で広く研究が行われてきた。1970年代に生体よりヘモグロビンA1c (HbA1c)が同定され、これはヘモグロビンβ鎖のN末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位物であることが明らかとなった。さらに、ラットにおいてAGEs生成阻害剤であるAminoguanidine (1), Pyridoxamine (2)やBenfotiamine (3)は、糖尿病性腎症や網膜症の発症を遅延させることから、AGEsは単なる老廃物ではなく、創薬の標的分子としても注目されている。

2. AGEs 生成阻害剤について

AGEsはヒト皮膚の線維芽細胞にアポトーシスを誘導すること、糖尿病合併症や動脈硬化など加齢依存的な病態の発症に関与して増加する報告が多くなされている。それらを予防・治療する目的で、国内外で活発にAGEs生成阻害剤の開発が行われている。生体におけるAGEs関連疾患の予防と治療には、(i) AGEsの生成を阻害する、(ii) 生成したAGEsを分解する(AGE breaker)、(iii) AGEs受容体の拮抗阻害剤などが考えられる（図3）。(i)に関しては、アミノグアニジンやピリドキサミンなどによって糖化反応あるいは代謝経路から生成するカルボニル化合物を補足する「カルボニルトラップ型」、チアミンあるいはベンフォチアミンなどの「カルボニル化合物自体の生成抑制」、金属キレーターによって「酸化依存性AGEsの生成を抑制する」、N-phenacylthiazolium bromide (PTB)によって生成したAGEsを分解する「AGEsブ

レーカー」などが考えられている。我々は、N-(carboxymethyl)lysine (CML) (4)、N-(carboxyethyl)lysine (CEL) (5) 等に特異的なモノクローナル抗体を用いて、ケトン体からAGEsが生成する可能性を検討した結果、ケトン体分解物であるアセトールから CEL が生成することを確認した。

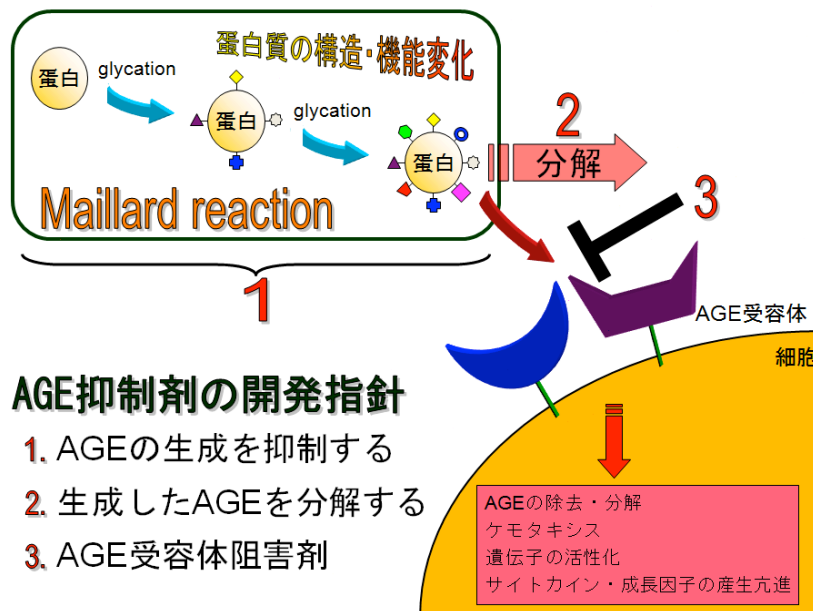


図 3 : AGEs 生成阻害剤の開発

我々はクエン酸の経口投与によってケトン体が改善する可能性を提唱し、実際、クエン酸をストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに経口投与した結果、ケトン体、腎機能障害が抑制され (図 4)、さらに白内障及び水晶体における CEL の蓄積が有意に低下することが確認された (6)。ケトン体は1型糖尿病のみならず、妊娠初期のつわり、過度な運動や急激なダイエットでも血中濃度が上昇する。クエン酸は多くの果物にも豊富に含まれており、有効に利用すれば糖尿病合併症のみならず、多くの疾患の予防にも役立てられる可能性が考えられる。

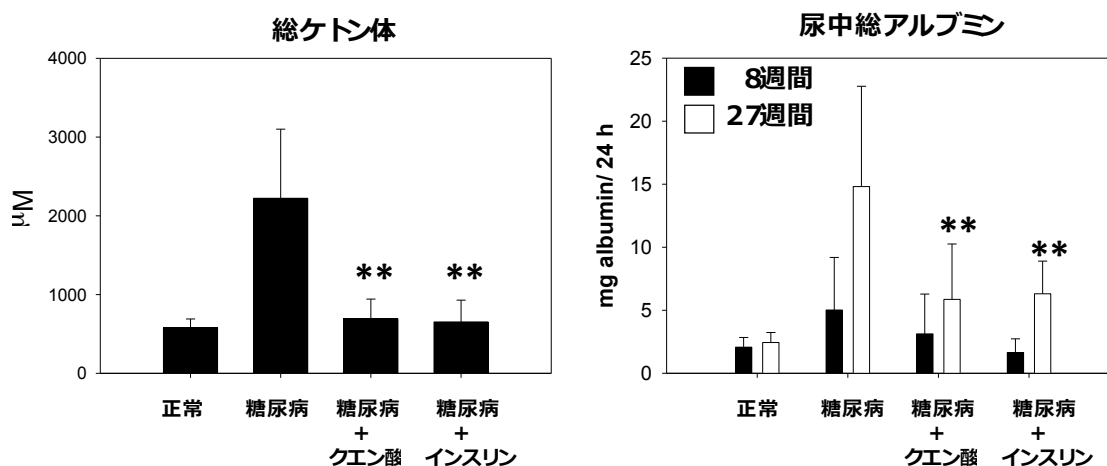


図 4 : クエン酸投与によるケトン体および腎機能の改善効果

上記は、まず病態に関与する AGEs 構造体を同定し、次にその生成経路を解析、最終的に効果的な生成阻害剤を探索したことによって得られた成果である。以前は生体に存在する AGEs 構造体の「種類」については余り議論がなされてこなかったが、生体には様々な AGEs 構造体や生成経路が存在することから、今後は「如何なる AGEs 構造体」について議論するのかを明確にすることが重要となるであろう。最近、脂肪細胞では TCA 回路中間体であるフマル酸がシステインと反応して S-(2-succinyl)cysteine (2SC)が生成すること、さらに、脂肪細胞内でアディポネクチン、細胞骨格蛋白、サイトカイン、ヒートショック蛋白など様々な蛋白が 2SC 化を受けるという新規な翻訳後修飾経路も明らかとなっている(7)。今後、蛋白の 2SC 化制御も新規な機能性食品の開発ターゲットとして注目されるであろう。つまり、アンチエイジングを目指したより効果的な AGEs 生成阻害剤を開発するには、まず標的となる AGEs 構造体およびその生成経路を明確にすることが重要となるであろう。また、金属のキレーターや抗酸化化合物は AGEs 生成阻害剤の有力候補となるが、ある種のフラボノイドは高濃度存在すると過酸化水素を産生し (8)、結果的に AGEs の生成を促進することも知られている(9)。したがって、抗酸化成分イコール AGEs 生成阻害剤とは考えず、実際に標的となる AGEs 構造体の生成阻害効果を *in vitro* および *in vivo* で確認することによって、アミノグアニジンを超える新規な AGEs 生成阻害剤の開発が可能になるであろう。

文献

1. Brownlee M *et al.*, Science 232: 1629-1632, 1986.
2. Onorato JM *et al.*, J Biol Chem 275: 21177-21184, 2000.
3. Babaei-Jadidi R *et al.*, Diabetes 52: 2110-2120, 2003.
4. Mera K *et al.*, J. Immunol. Methods 334: 82-90, 2008.
5. Nagai R *et al.*, J. Immunol. Methods 332: 112-120, 2008.
6. Nagai R *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 393: 118-122, 2010.
7. Nagai R *et al.*, J Biol Chem. 282: 34219-34228, 2007.
8. Akagawa M *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem. 67: 2632-2640, 2003.
9. Fujiwara Y *et al.*, Free Radic Biol Med. 50(7): 883-891, 2011.

III-1 幼雛期の摂食・エネルギー代謝調節における グルコース感受性に関する研究

○白石純一^{1,3}、杉野利久²、豊後貴嗣^{2,3}、太田能之¹、浜崎浩子^{3,4}
(¹日獣大応用生命、²広大院生物圏、³広大 JAB、⁴北里大一般教育)

【目的】

生体のエネルギー恒常性において、グルコースは重要なエネルギー供給源である。ニワトリにおいてもグルコース、および血糖調節ホルモンであるインスリンは各器官における機能維持、細胞の分化、増殖を制御する重要な因子である^{1),2),3)}。これまでに我々は、摂食・エネルギー代謝調節における中枢性インスリンは、哺乳類と類似してニワトリヒナの異化作用を促進すること、生産性を指標に育種改良された産卵鶏および肉用鶏では、その感受性が異なることを報告してきた⁴⁾。

本研究では、インスリンシグナルを核とした個体の摂食・エネルギー代謝調節における脳-末梢器官の情報ネットワーク機構について明らかにすることを目的として、初期成長期におけるグルコースおよびインスリンに対する感受性について鶏種間で検討した。

【材料および方法】

実験には産卵鶏（もみじ：MJ）および肉用鶏（チャンキー：CH）の種卵を導入し孵化させた。孵化後のヒナは自由摂食、24 時間点灯、環境温度 30°C 恒温条件下で飼育した。

実験 1：MJ および CH の成長指標の特性解析

孵化 0、2、10 日齢（P0、P2、P10）時における全脳、肝臓、脾臓、浅胸筋、大腿筋を採取し、それぞれの組織重量を測定した。また、試験期間中の両鶏種の体重および飼料摂取量を計測した。試験終了後、両鶏種ヒナから血液を採取し、血漿グルコース、インスリン、ノルアドレナリンおよびアドレナリン濃度を測定し、各日齢と鶏種間で比較した。

実験 2：MJ および CH における糖負荷試験（Glucose Tolerance Test: GTT）

P0 および P10 において、MJ および CH の頸部皮下にグルコース溶液（200mg）を投与し、投与 0、15、30、60 および 120 分後の血液を翼下静脈から採取し、血中グルコース濃度および血糖総和面積（Area Under the Curve: AUC）を算出し、比較した。

実験 3：MJ および CH におけるインスリン負荷試験（Insulin Tolerance Test: ITT）

P0におけるMJおよびCHの腹腔にインスリン溶液(2 μ g)を投与し、投与0、15、30および60分後の血液を翼下静脈から採取し、実験2と同様に、血中グルコース濃度およびAUCについて両者間で比較した。

【結果および考察】

P0の体重は鶏種間で差は示さなかったが、その後、CHのものがMJのものにくらべ高く、P10では約3倍高くなり、飼料摂取量においては約4倍高かった。各組織重量についてはP0では差は示さなかったものの、P2ではCHの全脳、肝臓、脾臓および大腿筋重量が、P10においてはすべての項目がMJのものに比べて高くなることが示された。血漿グルコース、インスリン、ノルアドレナリンおよびアドレナリンについては日齢および鶏種間による差は示さなかった。一方、P0におけるGTTにおいてはグルコース負荷後120分、P10では15分後以降においてCHの血中グルコース濃度はMJのものに比べて低く、AUCについてもCHのものは低値を示した。そして、P0におけるITTではCHのAUCがMJのものに比べ、高かった。

以上のことから、増体を指標に改良されてきたCHは初期成長期におけるグルコースおよびインスリンに対する応答性は早く、これらの早い応答性は、成長指標に差がみられない孵化直後には既に備わっている可能性が示唆された。

- 1) Braun EJ, Sweazea KL. Glucose regulation in birds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 151: 1-9, 2008.
- 2) Dupont J, Tesseraud S, Simon J. Insulin signaling in chicken liver and muscle. *Gen Comp Endocrinol.* 163: 52-57, Review, 2009.
- 3) Sato K, Aoki M, Kondo R, Matsushita K, Akiba Y, Kamada T. Administration of insulin to newly hatched chicks improves growth performance via impairment of MyoD gene expression and enhancement of cell proliferation in chicken myoblasts. *Gen Comp Endocrinol.* 175: 457-463, 2012.
- 4) Shiraishi J, Yanagita K, Fukumori R, Sugino T, Fujita M, Kawakami S, McMurtry JP, Bungo T. Comparisons of insulin related parameters in commercial-type chicks: Evidence for insulin resistance in broiler chicks. *Physiol Behav.* 103: 233-239, 2011.

III-2 飼育下における雌スバルバルライチョウ *Lagopus mutus hyperboreus* の繁殖周期

仲村 賢^{1*}、野下智洋^{1*}、黒瀬恵久^{1*}、高橋幸裕²、齋當史恵²、石井淳子^{2*,3**}
山本彩織⁴、楠田哲士⁴、○小川 博¹

(¹東京農業大学、²恩賜上野動物園、³東京都多摩動物公園野生生物保全センター、
⁴岐阜大学応用生物科学部、*旧所属、**現所属)

【背景と目的】

日本のライチョウ *Lagopus mutus japonicus* は、本州中部の高山帯にのみ生息し、他の地域のライチョウと完全に隔離された、世界最南端に分布するライチョウである。個体数が少なく遺伝的多様度が低いことから、環境破壊による絶滅が危惧されている。東京都恩賜上野動物園では、将来におけるニホンライチョウの飼育繁殖技術確立に資するため、ニホンライチョウの亜種であるスバルバルライチョウ *Lagopus mutus hyperboreus* の人工繁殖技術の確立を目指し飼育下繁殖に成功している。そこで、本研究はスバルバルライチョウの繁殖周期を明らかにしようとした。

【材料および方法】

調査は2010年5月から2012年6月にかけて、恩賜上野動物園で飼育されているスバルバルライチョウの雌11羽を用いて行った。調査項目は、産卵、羽装、換羽した羽根の重量、糞中プロゲステロンおよびエストラジオール濃度を調べた。供試鳥は夏期の室温が上昇しないよう冷房を20°Cに設定した室内に設置した単飼ケージに収容し、日本の自然光周期または生息地の自然光周期に準じた照明条件(表1)で飼育を継続した。飼料および飲水は自由摂取とした。糞中性ステロイドホルモンは、酵素免疫測定法により測定した。

表1. 光周期 (生息地光周期区)

月	光周期	月	光周期
1月	11L:13D	7月	24L:0D
2月	12L:12D	8月	17L:7D
3月	13L:11D	9月	15L:9D
4月	15L:9D	10月	13L:11D
5月	17L:7D	11月	12L:12D
6月	24L:0D	12月	11L:13D

【結果と考察】

① 産卵は、2010年は5月の第2～4週に始まり7月の第3週には全ての個体(n=8)で終了した。産卵期間は5～8週間であった。産卵数は、25.2±1.69個(平均値±標準誤差)で18～35個の範囲であった。日本の光周期条件下で飼育した個体(n=3)には産卵が認められなかった。2011年は5月の第3週、第4週および6月の第3週に産卵を開始した(n=3)。産卵期間はいずれの個体も6週間で、産卵数はそれぞれ25, 26および27個であった。2012年は調査した2個体とも6月の第2週に産卵を開始し、産卵期間は6週間であった。産卵数は19個および24個であった。

② 2010年に7個体の羽装の変化を観察した結果、5月初旬の観察開始時にはすでに冬羽から夏羽根への移行中であり、6月第3週に夏羽への換羽が完了し7月の第2週まで夏羽のまま推移した。その後産卵期の末期から冬羽根への換羽が始まり、9月の第4週には純白の冬羽への換羽が終了した。日本の光周期条件下で飼育した雌3羽については6月の第1週まで冬羽で推移し、その後1羽は部分的に茶色の夏羽に換羽したが、他は白い羽装のまま推移した。

2011年6月から2012年6月まで雌2羽について、個体別に脱落した羽毛の重量を調べた結果、夏羽から冬羽への換羽量は産卵期の終わりから増加し始め、産卵終了後1~2週間後に最高値を示した後徐々に減少した。冬羽から夏羽への換羽量は、4月の第2週から3週にかけて急増して最高値を示した後、徐々に減少した。

③ 糞中プロゲステロン濃度およびエストラジオール濃度は、産卵の開始と共に上昇し、産卵期に高い値を示した後、産卵の終了に伴い低下した。その直後に夏羽から冬羽への換羽が認められたが、冬羽から夏羽への換羽時には低い値のまま推移した。

以上のことから、スバルバルライチョウは日本の光周期下では産卵しないことが明らかとなった。また、生息地に準じた光周期で飼育した場合、産卵が見られた時期や夏羽でいた時期は、生息地とほぼ同じであった (Stokkan *et al.*, 1986)。夏羽から冬羽根への換羽は、産卵の終了と糞中ステロイドホルモンの低下直後に認められたことと、生息地での研究において6月から8月にかけてスバルバルライチョウの血中トリヨードチロニン (T3) 濃度の上昇が認められたこと (Stokkan *et al.*, 1985) から、ニワトリやウズラなどの家禽と同様、性腺の退縮による血中エストラジオール濃度の低下と甲状腺ホルモン濃度の上昇が換羽を引き起こす要因であると思われた。冬羽から夏羽への換羽を誘起する要因については、生息地における研究 (Stokkan *et al.*, 1986) で、5月初旬に血中T3の上昇傾向が認められていることから、何らかの関係があるかもしれない。

参考文献

1. K.A.Stokkan, S.Harvey, H.Klandorf, S.Unander and A.S.Blix, 1985, Endocrine changes associated with fat deposition and mobilization in Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *General and Comparative Endocrinology* 58: 76-80.
2. K.A.Stokkan, P.J.Sharp and S.Unander, 1986, The annual breeding cycle of the high-arctic Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *General and Comparative Endocrinology* 61: 446-451.

III– 3 Effects of melanin and estradiol on the expression of *NLRC5* in the oviduct of laying and molting hens

Abdel-Mageed Ahmad Mohammad^{1,2}, Isobe Naoki¹ and Yoshimura Yukinori¹.

(¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,

²Faculty of Science, Minia University, Egypt.)

Introduction

Infections of the oviduct by pathogenic microorganisms may cause disorder in its function and production of contaminated eggs. Chicken oviduct can be infected by ascending microorganisms colonized in the cloaca through the vagina (Miyamoto *et al.*, 1997). The innate immunity of the oviduct is the first line of defense against microbial infection (Sonoda *et al.*, 2013). The innate immunity is initiated by recognizing specific pathogenic components known as pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by specific receptors. Different types of receptors have been reported to recognize PAMPs such as Toll-like receptors (TLRs) and intracellular nucleotide-binding oligomerization (NOD)-like receptors (NLRs). *NLRC5* is one of the NLRs that is capable of regulating the innate and adaptive immune responses, and its function may be cell type and species specific (Davis *et al.*, 2011). Melanin is an immunoenhancing substance synthesized by some herbs such as *Nigella sativa*, and it is assumed that it activates the TLR4/NFκB signaling pathway. The aims of this study are to determine the expression profile of *NLRC5* in the mucosal tissue of the oviduct of laying hens and the effect of melanin, oviductal regression, and estradiol treatment on its expression in the regressed oviduct.

Materials and Methods

While Leghorn laying hens were used. Some of them were injected with melanin or saline (control). The other birds were subjected to feeding restriction to induce molting, and the regression of the oviduct was confirmed by continuing the feeding restriction. After 20 days of the egg laying cessation, some of them were injected with sesame oil or estradiol benzoate at 24 h before examination. Tissue samples from different segments of the oviduct were collected from laying and molting hens injected with or without estradiol, fixed in formalin, and processed for HE staining. To localize the expression on *NLRC5*, RNA was extracted from the mucosal surface epithelium and lamina propria, separately isolated by laser microdissection in all oviductal segments of laying hens. The *NLRC5* expression was examined by RT-PCR in them. To examine the changes in the *NLRC5* expression in response to melanin, molting, and estradiol, RNA was extracted from the whole mucosal tissue of the magnum, isthmus, uterus and vagina of laying hens, molting hens, and molting hens injected with or without estradiol. The expression was examined by RT-PCR and quantitative real

time PCR.

Results and Discussion

In molting hens, the mucosal surface epithelial cells were smaller in size than laying hens with complete regression of the tubular glands in the magnum, isthmus and uterus. Compared to molting hens, the tubular glands of the estradiol-treated birds were more developed. The *NLRC5* mRNA was expressed in the surface epithelium and lamina propria from the infundibulum to vagina of laying hens. It was reported that NLRC5 recognizes LPS and Poly I:C (Lian *et al.*, 2012). Thus, it is suggested that NLRC5 may recognize pathogenic microorganisms such as *Salmonella enteritidis* invading the oviductal mucosa. The expression of *NLRC5* in the isthmus and uterus was significantly higher in molting hens compared to laying hens, although significant difference was not obtained in magnum and vagina between those birds. We assume that the relative level of *NLRC5* mRNA within the total mRNA may be higher in molting than laying hens to assist TLRs in recognizing pathogens during molting period. Estradiol treatment decreased the expression of *NLRC5* in the magnum and uterus of molting hens. Molting is associated with a decline in the estrogen level, hence, it was suggested that the expression level was returned to the normal level of laying hens by estradiol stimulation. The mRNA expression of NLRC5 was not changed in response to melanin treatment neither in uterus nor in vagina. In conclusion, the current results suggest that *NLRC5* is expressed in the oviduct probably to play a role in recognition of pathogens in both laying and molting hens. Its expression may be affected by estradiol, but not by melanin.

References

- (1) Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T., Arakawa, A. 1997. Salmonella Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. Avian Dis. 41, 296-303.
- (2) Sonoda. Y., Abdel Mageed, A.M., Isobe, N., Yoshimura, Y., 2013. Induction of avian β -defensins by CpG oligodeoxynucleotides and proinflammatory cytokines in hen vaginal cells in vitro. Reproduction 21, 621-31.
- (3) Lian, L., Ciraci, C., Chang, G, Hu, J, Lamont, S. J., 2012. NLRC5 knockdown in chicken macrophages alters response to LPS and poly (I:C) stimulation. BMC Vet. Res. 8, 23.
- (4) Davis, B.K., Roberts, R.A., Huang, M.T., Willingham, S.B., Conti, B.J., Brickey, W.J., Barker, B.R., Kwan, M., Taxman, D.J., 2011. Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome. J. Immunol. 1, 1333-1337.

Ⅲ-4 鳥類の松果体におけるニューロステロイドの生合成と生理作用

○筒井和義、原口省吾
(早稲田大・教育総合科学・統合脳科学)

【背景と目的】

これまでの研究により、脳神経系がコレステロールをもとに独自にステロイドを合成していることが明らかになっている。この脳神経系が独自に合成するステロイドをニューロステロイドと呼ぶ。これまで、ニューロステロイドは脳神経のニューロンとグリア細胞で合成されると考えられてきた。一方、最近の我々の研究により、脳近傍（一部の動物では脳内）に存在する内分泌器官である松果体が脳よりも活発にニューロステロイドを合成していることが明らかになった^{1,2)}。我々は、主としてニホンウズラ (*Coturnix japonica*) を用い、(1) 松果体におけるニューロステロイド合成経路の大略を明らかにし、次に(2) 松果体で合成される主要なニューロステロイドを同定し、(3) 松果体で合成される主要なニューロステロイドの生理作用を明らかにした²⁾。

【松果体のニューロステロイド合成経路の大略】

ステロイド合成経路の起点となるプレグネノロンはコレステロールを基質として StAR と P450scc の働きにより合成される。我々は、最初にウズラの松果体に P450scc と StAR の mRNA が発現していることを RT-PCR 法により見いだした²⁾。次に、ウズラの松果体に ³H 標識コレステロールを加えてインキュベーションすると、プレグネノロンが生合成されることを見いだした²⁾。さらに、GC-MS を用いた解析により、ウズラの松果体内にプレグネノロンが存在していることを見いだした²⁾。これらの結果から、ウズラの松果体ではコレステロールからプレグネノロンが生合成されることが明らかになった。さらに、一連の解析により、松果体ではコレステロールを基に、プレグネノロン、7 α -ヒドロキシプレグネノロン、7 β -ヒドロキシプレグネノロン、プロゲステロン、アロプレグナノロン、エピプレグナノロン、アンドロステンジオン、テストステロン、5 α -ジヒドロテストステロン、5 β -ジヒドロテストステロン、エストラジオールといったニューロステロイドが生合成されることがわかった²⁾。

【松果体はアロプレグナノロンと 7 α -ヒドロキシプレグネノロンを活発に合成・放出する】

続いて、我々はウズラの松果体で合成される主要なニューロステロイドを同定した。ウズラの松果体に ³H 標識プレグネノロンを加えてインキュベーションすると、アロプレグナノロンとその異性体であるエピプレグナノロン、7 α -ヒドロキシプレグネノロンとその異性体である 7 β -ヒドロキシプレグネノロンが活発に合成されることがわかった²⁾。詳細に解析した結果、以上の活発に合成される松果体ニューロステロイドの中でアロプレグナノロンと 7 α -ヒドロキシプレグネノロンが松果体から放出されることが明らかになった²⁾。さらに、松果体のニューロステロイド合成は孵化直後の雛の時期に高まることが見いだされた²⁾。以上の結果から、松果体で合成されたアロプ

レグナノロンと 7 α -ヒドロキシプレグネノロンは、孵化直後において何らかの重要な働きをしていることが考えられた。

【松果体で合成・放出されたアロプレグナノロンは小脳プルキンエ細胞の生存を保護する】

鳥類では、孵化直後の時期には脳の形成は完成しておらず、神経細胞の移動や成長、神経回路網の構築などが行われている。孵化直後に松果体を除去すると、小脳ではプルキンエ細胞数が減少することが報告されている³⁾。我々は、松果体で合成されるアロプレグナノロンと 7 α -ヒドロキシプレグネノロンがプルキンエ細胞の生存を保護していると考えて解析を進めた。その結果、松果体除去により生じるプルキンエ細胞数の減少はアロプレグナノロン投与により抑制されることが見いだされた²⁾。さらに、アロプレグナノロンは細胞死を誘導する因子であるカスパーゼ3の発現を抑えてプルキンエ細胞の生存を保護していることが明らかになった²⁾。一方、7 α -ヒドロキシプレグネノロンにはプルキンエ細胞の生存保護作用はなかった²⁾。

【まとめ】

本研究により、松果体が活発に合成・放出する主要なニューロステロイドであるアロプレグナノロンは小脳のプルキンエ細胞の生存を保護していることがわかった^{2,4)}。今後、松果体が合成・放出するアロプレグナノロンの合成制御機構と作用機構の詳細な解析が必要である^{2,4)}。

文献

- 1) Hatori M, Hirota T, Iitsuka M, Kurabayashi N, Haraguchi S, Kokame K, Sato R, Nakai, Miyata T, Tsutsui K, Fukada Y (2011) Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** 108: 4864-4869.
- 2) Haraguchi S, Hara S, Ubuka T, Mita M, Tsutsui K (2012) Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA** 109: 21110-21115.
- 3) Tunç AT, Turgut M, Aslan H, Sahin B, Yurtseven ME, Kaplan S (2006) Neonatal pinealectomy induces Purkinje cell loss in the cerebellum of the chick: a stereological study. **Brain Res** 1067: 95-102.
- 4) Tsutsui K, Haraguchi S, Fukada Y, Vaudry H (2013) Brain and pineal 7 α -hydroxypregnenolone stimulating locomotor activity: Identification, mode of action and regulation of biosynthesis. **Front Neuroendocrinol** 34: 179-89 (review).

III-5 ウズラの精子貯蔵管で精子の運動を制御する分子の探索

○笹浪知宏、松崎芽衣、檜山源、水島秀成
(静岡大学大学院農学研究科)

【目的】

鳥類の輸卵管の子宮-膣移行部(utero-vaginal junction; UVJ)には精子貯蔵管(sperm storage tubules; SST)と呼ばれる構造が存在し、交尾後、射出された精子をSST内で一定期間貯蔵することができる。SST内の貯蔵精子は運動を停止しており(Bakst, 1987)、卵子が排卵されるまでの間、SSTの中で受精のタイミングを待っている。これまでの研究で、SST内で貯蔵されている精子は、排卵周期と同調して、プロゲステロンの刺激により卵管内腔へと放出され(Ito *et al.*, 2011)、さらに、これと同調してUVJ上皮から放出される分子シャペロンが精子を再活性化することが分かった(Hiyama *et al.*, submitted)。しかし、射出された精子が如何にしてSST内に侵入し、そこで長期間維持されるのかについての一連の現象の分子機構は未だに解明されていない。

そこで本研究では、SST内で精子の運動を制御する生理活性物質の単離を試みた。

【材料および方法】

雄ウズラから交尾中断法によって射出精子を採取し、ハンクス平衡塩類溶液に懸濁して実験に使用した。400万精子/mlになるよう精子懸濁液を希釈し、39°Cでインキュベートしながらハイスピードカメラを用いて精子の運動を記録した。産卵を繰り返しているウズラからUVJを摘出し、湿重量50 mg/mlとなるようにPBS中で細切し抽出を行った。細胞片を低速遠心で落としした後、上清を20,000 x g、4°Cで10分間遠心し、UVJ抽出物を得た。UVJ抽出物を凍結乾燥させ、少量のPBSに溶解した後、Superdex 200pgによるゲル濾過クロマトグラフィーの供した。精子の運動抑制活性を有する画分をC22逆相カラムを用いたHPLCおよびpreparative TLCにより分画し、活性を追跡した。活性画分を¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY およびHMQC解析に供し、構造決定を行った。タンパク性成分に関しては、ゲル濾過画分をC8逆相カラムを用いたHPLCにより分画し、活性を追跡した。活性画分をSDS-PAGEで分離し、in-gel digestionにより得られたペプチド断片をLC-MS/MS解析に供し、タンパク質の同定を行った。

【結果および考察】

射出精子をゲル濾過分画とインキュベートすると、分子量10 kDa以下の画分に精

子の運動が不活発にし、鞭毛を伸ばす活性があることがわかった。また、分子量 40-100 kDa の位置に、精子の運動継続時間をインビトロで延長する活性があることが分かった。分子量 10 kDa 以下のゲル濾過分画を C22 逆相カラム及び preparative TLC で分離し、活性を追跡したところ、精子の運動抑制物質は親水性低分子であることが予測された。構造解析の結果、この活性成分は有機酸であると考えられた。分子量 40-100 kDa のゲル濾過分画を C8 逆相カラムで分画したところ、溶出体積 16 および 18ml に活性が認められ、SDS-PAGE による分画で、それぞれ 70 kDa および 60 kDa 付近にバンドが検出された。LC-MS/MS によりタンパク質を同定したところ、この分画には活性酸素種の除去活性を有する既知のタンパクが含まれていることがわかった。

これらの結果から、鳥類の SST では、SST 内に含まれる有機酸による精子運動の抑制とタンパク質による活性酸素種の除去が長期間の精子貯蔵に重要である可能性が推察された。

〈引用文献〉

1. Bakst, M.R., Anatomical basis of sperm-storage in the avian oviduct. *Scanning Microsc.*, **3**: 1257-1266 (1987).
2. Ito, T., Yoshizaki, N., Tokumoto, T., Ono, H., Yoshimura, T., Tsukada, A., Kansaku, N. and Sasanami, T. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology*. **10**: 3952-3962 (2011).
3. Hiyama, G., Matsuzaki, M., Mizushima, S., Dhora, H., Ikegami, K., Yoshimura, T., Shiba, K., Inaba, K. and Sasanami, T. Sperm activation by heat shock protein 70 support migration of released sperm from the sperm storage tubules in birds, *submitted*.

III-6 グレリンの胃腸管運動亢進作用における鳥類の特異性 —種々の脊椎動物の摘出平滑筋標本を用いての検討—

○北澤多喜雄¹、寺岡宏樹¹、海谷啓之²

(¹酪農学園大学、²国立循環器病研究センター)

【背景】グレリン (GHRL) は胃粘膜で生合成されるペプチドであり、その生理活性は成長ホルモン (GH) 分泌刺激、摂食増加、内・外分泌調節作用など多岐にわたる。GHRL およびその受容体 (growth hormone secretagogue receptor 1a, GHS-R1a) の構造がヒト、イヌで空腹期伝播性収縮の mediator と考えられるモチリン (MOT) とその受容体に類似すること、両ペプチドが胃腸管の粘膜に存在することから、GHRL と MOT は祖先を同じくする生理活性物質と考えられている。MOT が哺乳動物で胃腸管運動を調節していることから、GHRL においてもその消化管収縮に与える効果が注目され、様々な動物種で研究がおこなわれている。意識下または麻酔下のマウス、ラット、モルモット、スunksにおいては GHRL が迷走神経を介し反射性に胃運動を亢進させることが報告されている。しかしながら、迷走神経を切断した動物においても亢進作用が観察されることから、腸内在性神経に直接作用し運動亢進を惹起する可能性も示唆されている。摘出消化管標本を用いた *in vitro* 実験系は、幅広い動物種に適用することが可能で活性物質の胃腸管への作用を直接解析できる有用な方法である。我々はこの方法を用い、これまで GHRL の胃腸管収縮作用が系統発生過程で変化するか否かに注目し魚類から哺乳類まで種々の動物を用いて GHRL の胃腸管運動に対する作用の解析を行ってきた[1-6]。その結果、鳥類が GHRL の消化管運動におよぼす影響を検討する上で極めて興味深い動物種であることが解ってきた。今回は他の動物での結果と比較しながら、鳥類の特異性を紹介したい。

【方法】実験には、魚類のキンギョ、ニジマス、両生類のウシガエル、鳥類のウズラ、ニワトリ、哺乳類のモルモット、ラットを用いた。消化管を胃、小腸、結腸 (鳥類ではそ嚢、腺胃、小腸、結腸) などの部位に分けて摘出し栄養液を入れた浴槽中 (マグナス管) に懸垂し、収縮活性を等尺性に記録した。GHRL や他の活性物質は浴槽中に直接滴下し適用した。標本には必要に応じてフィールド電気刺激を加え、内在性腸神経を興奮させた際の反応に対する GHRL の影響も検討した。また、実験に使用した胃腸管部位については、GHRL 受容体 (GHS-R1a) mRNA の発現を定量的 PCR 法で解析した。

【結果】魚類: キンギョとニジマスはGHRLの適用によって摂食亢進あるいは無効 (中枢投与では抑制) と異なる反応を示す魚類である。これら魚類の胃小腸条片の収縮活性は、それぞれの種に固有なGHRLの適用によっても殆ど変化しなかった。一方、カルバコール、セロトニン、ニューロメディン-Uでは濃度依存性の収縮が観察された。キンギョ胃の電気刺激誘発性 (神経性) 収縮もGHRLによっては影響を受けなかった。しかしながら、キンギョの胃腸管には2種類の受容体(GHS-R1a-1とGHS-R1a-2)

mRNAが均一に分布していた[5]。

両生類：ウシガエル胃腸管の収縮活性はGHRLでは殆ど影響を受けなかったが、カルバコール、サブスタンス Pにより著明な収縮が誘起された。胃腸管全体にGHS-R1a mRNAの発現が認められた。

鳥類：ニワトリのそ嚢、腺胃、結腸標本はニワトリGHRLにより収縮したが、小腸での収縮反応は弱かった。そ嚢のGHRL収縮には平滑筋上のGHS-R1aが、腺胃の収縮にはコリン作動性神経と平滑筋上のGHS-R1aが関与していた[1,2]。日齢経過（孵化後1-100日）によりGHRLの収縮反応は腺胃では減少したが、そ嚢では殆ど変化しなかった。一方、カルバコール誘発性収縮は日齢によっても不変であった。GHS-R1a mRNA発現量は、胃腸管部位による差が認められた（上部と下部消化管で高く小腸部が低い）。腺胃における受容体発現は日齢に従って減少したが、そ嚢では有意な日齢による変化は認められなかった。この結果はGHRL収縮の日齢変化と一致した[6]。一方、ウズラの胃腸管でもニワトリと同程度のGHS-R1a mRNAの発現が観察されたが（部位依存性も同じ）、ウズラGHRLはニワトリ胃腸管ではニワトリGHRLとほぼ同じ収縮活性を示すにもかかわらず、ウズラ胃腸管に対する収縮反応はニワトリ胃腸管での収縮に比較し有意に低かった[2]。

哺乳類：モルモットは、*in vivo*ではGHRLによる胃運動亢進を認めたが、摘出標本では一部回腸標本で収縮が出現するもののGHRLによる作用は殆ど誘起されなかった。この結果は、ラット摘出胃腸管での成績と一致していた。一方、電気刺激標本ではGHRLにより弛緩反応の増加、アセチルコリン放出の低下が認められ、これら抑制作用にはNO系の関与が示唆された。モルモット胃腸管におけるGHS-R1a mRNAの発現は、ラットやニワトリ消化管での発現に比べて極めて低値であった[3,4]。

【まとめ】 GHRLの摘出消化管標本に対する作用には著明な動物種差が認められた。このことはGHRLの消化管運動亢進作用が必ずしも系統発生過程で共通の機能ではないことを示唆する。一方、ニワトリではGHRLが消化管を部位特異的に収縮させ、その大きさが成長により変化した。これらのことから、GHRLの摂食調節、消化管運動とそれに伴う成長に与える影響を調べる上で、鳥類は興味深い実験モデルになると考えられる。

参考論文

- (1) Kitazawa *et al.*, Peptides, 28: 617-624 (2007)
- (2) Kitazawa *et al.*, Regul. Pept., 158: 132-142 (2009)
- (3) Nakamura *et al.*, Neurogastro. Motil., 22: 446-452 (2010)
- (4) Kitazawa *et al.*, Peptides, 32: 1876-1886 (2011)
- (5) Kitazawa *et al.*, Gen. Comp. Endocrinol., 178: 539-545 (2012)
- (6) Kitazawa *et al.*, Peptides, 43: 889-895 (2013)

尚、本研究の一部は、平成23年度科学研究費助成金（23570081，代表者：北澤多喜雄）の助成を受け行われたものである。

MEMO